

B48



⑮ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 12 332 A 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
C 12 Q 1/68
// G01N 33/574

⑲ Aktenzeichen: 197 12 332.5
⑳ Anmeldetag: 25. 3. 97
㉑ Offenlegungstag: 1. 10. 98

DE 197 12 332 A 1

⑦① Anmelder:

Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim,
DE

⑦② Erfinder:

Dietmaier, Wolfgang, Dr., 93049 Regensburg, DE;
Rüschoff, Josef, Prof., 93077 Bad Abbach, DE;
Fishel, Richard, Prof., Penn Valley, Pa., US

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ Verfahren zum Nachweis von Mikrosatelliten-Instabilität zur Tumordiagnostik

⑤⑦ Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung genomischer Instabilität an 5 ausgewählten Mikrosatelliten Loci. Die Analyse dieser ausgewählten Loci ist geeignet zur Erstellung von prognostischen Tumordiagnosen, zur Analyse von erblicher Tumoprädisposition sowie zur Tumorfürherkennung. Besondere Bedeutung hat diese Methode bei der Diagnose von Tumoren des Gastrointestinaltraktes, beispielsweise Colorectal Tumoren.

DE 197 12 332 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und einen Kit zur prognostischen Diagnostik, Prädispositionsdiagnostik bzw. Früherkennung von Tumoren des Gastrointestinaltraktes, Vorzugswise Colorectal Tumoren. Grundlage dafür bildet der Nachweis genomischer Instabilität von sogenannten Mikrosatelliten mit Hilfe von PCR.

Mikrosatelliten (MS) sind kurze Tandem Repeats, die über das gesamte menschliche Genom verteilt vorkommen. Statistisch treten Mikrosatelliten etwa einmal in 100 (XX) Basenpaaren auf. Bisher sind 5 Klassen von MS beschrieben, die sich nach der Länge ihrer kleinsten repetitiven Einheit als Mono-, Di-, Tri-, Tetra-, oder Pentanukleotid-Repeat voneinander unterscheiden. In der Regel treten diese repetitiven Einheiten 10 bis 40 mal in Tandemanordnung wiederholt auf. Mikrosatelliteninstabilität (MIN) in Form kleiner Deletionen oder Insertionen kann bei vielen Tumorpacienten nachgewiesen werden, wenn man DNA aus Tumormaterial mit normaler DNA des gleichen Individuums vergleicht (Thibodeau et al. (1993), Science, 260, 816-819) (WO 94/19492). Dies geschieht durch Amplifikation der DNA mit Hilfe von PCR und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung der Amplifikationsprodukte. Als Ursache für MIN wird ein dauerhafter Replikationsdefekt der Tumorzellen angesehen (Parsons et al., (1993), Cell, 75, 1227-1236; Shibata et al., (1994) Nat. Genet. 6, 273-281). Solche Tumoren werden als "Replikation-Error-Positive" (RER+) klassifiziert. Ein RER+ Phänotyp ist charakteristisch für Colorectal Tumoren in Familien mit HNPCC (Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer) (Aaltonen et al. (1993), Science, 260, 812-816).

Die Analyse von Mikrosatelliten ist eine äußerst attraktive Methode sowohl für diagnostische Anwendungen als auch für die Untersuchung der Tumorgenese von RER+ Tumoren. Aufgrund ihrer einfachen Durchführbarkeit ist die Bestimmung der MIN vor der Sequenzierung der Mismatch Repair Gene von HNPCC Familien ein geeignetes Hilfsmittel zur Identifizierung potentieller RER+ Patienten. Ebenfalls von großer Bedeutung ist die MIN Analyse als prognostische Diagnose bei sporadischem Colorectal-Karzinom, weil das Auftreten von MIN mit einer besseren Prognose korreliert (Lothe et al. (1993) Cancer Res., 53, 5849-5852; Thibodeau et al. (1993), Science, 260, 816-819; Bubb et al. (1996) Oncogene, 12, 2641-2649).

MIN kann in mehr als 90% aller HNPCC Tumoren nachgewiesen werden (Liu et al., (1996) Nature Med., 2, 169-174), wohingegen MIN in sporadischen Colorectal Tumoren nur mit einer Häufigkeit von 10-20% auftritt (Thibodeau et al. (1993) Science, 260, 816-819; Ionov et al. (1993), Nature, 363, 558-561; Aaltonen et al. (1993) Science, 260, 812-816; Lothe et al. (1993) Cancer Res., 53, 5849-5852). MIN ist jedoch nicht auf Colorectal Tumoren beschränkt, sondern wurde auch in anderen Tumoren nachgewiesen. Dazu zählen unter anderem Pankreaskarzinome (Han et al. (1993) Cancer Res., 53, 5087-5089), gastrische Karzinome (Han et al. (1993) Cancer Res., 53, 5087-5089; Peltomäki et al. (1993) Cancer Res., 53, 5853-5855; Mironov et al. (1994) Cancer Res., 54, 41-44; Rhyu et al. (1994) Oncogene, 9, 29-32; Chong et al. (1994) Cancer Res., 54, 4595-4597), Prostata-Karzinome (Gao et al. (1994) Oncogene, 9, 2999-3003), Karzinome des Endometriums (Risinger et al. (1993) Cancer Res., 53, 5100-5103; Peltomäki et al. (1993) Cancer Res., 53, 5853-5855) und Mammarykarzinome (Patel et al. (1994) Oncogene, 9, 3695-3700).

Der Mechanismus der Tumorgenese von RER+ Tumoren ist nicht im Detail bekannt. Bisher wurden fünf Gene identifiziert, deren Defekt zu einem Auftreten des RER+ Phänotyps führen kann. Da in HNPCC Familien sowohl für hMLH1 (Bronner et al. (1994) Nature, 368, 258-261) als auch für hMSH2 (Fishel et al. (1993) Cell, 75, 1027-1038; Leach et al. (1993) Cell, 75, 1215-1225) genetische Variabilitäten mit einer Häufigkeit von über 30% nachgewiesen wurden, spielen diese beiden Gene offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Ausprägung von MIN. 2 andere Mismatch Repair Gene, hPMS1 und hPMS2 sind in weniger als 5% aller HNPCC Patienten mutiert, so daß diese Gene wohl eine eher untergeordnete Rolle in RER+ Tumoren spielen. Es ist jedoch davon auszugehen, daß noch weitere, bisher unbekannte Gene an einem effektiven Mismatch Repair beteiligt sind.

Es besteht Grund zu der Annahme, daß MIN eine direkte Rolle bei der Tumorgenese dadurch spielt, daß aufgrund von Defekten im Mismatch Repair System Mikrosatelliten im kodierenden Bereich von Genen mutiert werden, die für die Regulation der Zellproliferation von Bedeutung sind. Beispielsweise wurde ein Repeat von 10 Desoxyadenosinen im kodierenden Bereich des TGF β 1-Rezeptor Gens als MIN-Target identifiziert (Markowitz et al., (1995) Science, 268, 1336-1338). Ein weiteres MIN-Target, das hHNPCC-Gen, ist in gastrointestinalen Tumoren innerhalb seiner kodierenden Region an einem (G)_n Repeat mutiert (Souza et al. (1996) Nat. Genet., 14, 255-257). Interessanterweise waren nur 10% aller untersuchten Tumoren mit MIN in beiden Genen mutiert. Ein anderer (G)_n MS innerhalb eines Histone-Gens war in keinem der untersuchten Tumoren mutiert (Souza et al. (1996) Nat. Genet., 14, 255-257). Darüber hinaus konnte MIN bisher nur an einem Teil der untersuchten Loci nachgewiesen werden. Ob und inwieweit sich Mikrosatelliten, an denen Instabilität bereits nachgewiesen wurde, hinsichtlich der Häufigkeit des Auftretens von MIN unterscheiden, war zum Zeitpunkt der Erfindung nicht bekannt.

Vielmehr existieren für die Wahl von geeigneten Loci zur Analyse von MIN derzeit keine weiteren Anhaltspunkte. Es ist somit nicht bekannt, ob und wenn ja, welche Loci sich am besten zur eindeutigen Bestimmung von RER+ Phänotypen eignen. Stand der Technik hingegen ist die Analyse von 4 bis 7 zufällig ausgewählten Loci zur Klassifikation des MIN Status beispielsweise in Colorectalkarzinomen (z.B. Aaltonen et al. (1993) Science, 260, 812-816; Thibodeau et al. (1993) Science 260, 816-819; Lothe et al. (1993) Cancer Res., 53, 5849-5852; Kim et al. (1994) Am. J. Path., 145, 148-156; Bubb et al. (1996) Oncogene, 12, 2641-2649; Plummer and Cascy, (1996) Nat. Med., 2, 156-158).

Am häufigsten wurden dabei Mono- und Dinukleotid-Loci analysiert. Dinukleotid-Repeat Loci lassen sich in diesem Zusammenhang in 2 verschiedene Klassen einteilen:

Nicht-komplexe Loci, welche innerhalb der zu amplifizierenden Region außer dem Dinukleotid Repeat keine weiteren repetitiven Elemente aufweisen (Klasse 2a). Zu diesen Loci gehören APC, D13S175, D3S1283, Mfd26, Mfd28 und Mfd41.

- Komplexe Loci, bei denen neben dem Dinukleotid-Repeat noch weitere repetitive Sequenzen auftreten (Klasse 2b). Zu diesen Loci gehören Mfd15, D10S197, D11S1318, D11S904, D18S69, D2S123, D9S171 sowie TFS3PCR.

Darüber hinaus wurden auch Mononukleotid-Repeat-Loci aufgrund ihrer guten Amplifizierbarkeit sowie ihrer eindeutigen gelelektrophoretischen Signale mehrfach untersucht (Liu et al. (1996) Nature Med., 2, 169-174; Augenlicht et al. (1996) Oncogene, 12, 1767-1772; Plummer and Casey, (1996) Nat. Med., 2, 156-158).

Grundlage der Erfindung war somit die Suche nach polymorphen Loci, deren Analyse eine zuverlässige Aussage über die allgemeine Tendenz zur genomischen Instabilität zuläßt. Dabei konnten an unterschiedlichen Mikrosatelliten, an denen bereits nach dem Stand der Technik MTN gefunden wurde, unterschiedliche Häufigkeiten polymorpher Veränderungen nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, daß in unterschiedlichen Patienten verschiedene Klassen von Mikrosatelliten mit unterschiedlicher Häufigkeit von genomischer Instabilität betroffen sind. Daraus folgt, daß für eine zuverlässige Bestimmung des RER Phänotyps mit einer begrenzten Anzahl an PCR-Reaktionen eine Analyse verschiedener Klassen von MTN unabdingbar ist.

Gegenstand der Erfindung ist deshalb ein tumordiagnostisches Verfahren zur Analyse von Mikrosatelliten-Loci, bestehend aus folgenden Schritten:

- a) Isolierung von genomischer DNA aus humanem biologischem Material
- b) DNA-Amplifikation von 5 verschiedenen Mikrosatelliten-Loci mit Hilfe von jeweils fünf verschiedenen Primerpaaren, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den zu amplifizierenden Loci um zwei Mononukleotid-Repeat-Loci, ein oder zwei Dinukleotid-Repeat-Loci der Klasse 2a, ein oder zwei Dinukleotid-Repeat-Loci der Klasse 2b und 0 bis 1 Pentanukleotid-Repeat Locus handelt.
- c) Größenbestimmung der Amplifikationsprodukte

Als vorteilhaft hat sich dabei insbesondere eine Ausführungsform erwiesen, bei der die 5 zu analysierenden Mikrosatelliten-Loci ausgewählt werden aus einer Gruppe von Loci bestehend aus: BAT 25, BAT26, BAT40, APC, Mfd15, D2S123, D18S69, und TP53Alu. Als besonders vorteilhaft hat sich eine spezielle Ausführungsform erwiesen, bei denen zur Analyse von 5 dieser Loci 5 Primerpaare aus einer Gruppe von Primern, repräsentiert durch SEQ ID NOs. 1, 2, 5, 6, 19, 20, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 45 und 46, ausgewählt werden.

In einer speziellen Ausführungsform werden die 5 Loci BAT26, BAT40, APC, Mfd15 und D2S123 analysiert. Dabei können 1 oder mehrere Primerpaare entsprechend den SEQ ID NO. 1, 2, 5, 6, 19, 20, 33, 34, 35, 36 verwendet werden.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Anwendung dieses Verfahrens zur Bestimmung des RER Phänotyps, dadurch gekennzeichnet, daß bei fehlendem Nachweis von Mikrosatelliten-Instabilität bei allen 5 untersuchten Loci von einem RER- Phänotyp und bei Nachweis von Mikrosatelliten-Instabilität bei mehr als einem Locus von einem RER+ Phänotyp ausgegangen wird.

Eine besondere Ausführungsform besteht in der Anwendung des Verfahrens zur prognostischen Diagnose von Tumoren, vorzugsweise bei Tumoren des Endometriums, des Gastrointestinaltraktes und insbesondere bei Colorectalumtoren.

Eine andere besondere Ausführungsform der Erfindung besteht in der Anwendung des Verfahrens zur Diagnose einer familiären Tumor-Prädisposition, vorzugsweise für Tumoren des Endometriums, des Gastrointestinaltraktes und insbesondere für Colorectalumtoren.

Eine weitere besondere Ausführungsform der Erfindung besteht in der Anwendung des Verfahrens zur Früherkennung von Tumoren durch Nachweis von Mikrosatelliten-Instabilität in disseminierten Tumorzellen.

Eine zusätzliche Ausführungsform der Erfindung besteht in der Anwendung des Verfahrens vor einer Entscheidung, welche Art von Chemotherapie für einen Patienten eingesetzt werden soll. Dies ist von Bedeutung, da die Durchführung von Chemotherapien häufig mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden ist, so daß ein für bestimmte Arten von Tumoren unwirksamer Einsatz eines solchen Therapeutikums nach Möglichkeit zu vermeiden ist.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Kit zur tumordiagnostischen Analyse von Mikrosatelliten-Instabilität, mindestens bestehend aus 5 Primer-Paaren, welche zur DNA-Amplifikation von zwei Mononukleotid-Repeat Loci, ein oder zwei Dinukleotid-Repeat-Loci der Klasse 2a, ein oder zwei Dinukleotid-Repeat-Loci der Klasse 2b und 0 bis 1 Pentanukleotid-Repeat Locus geeignet sind.

Eine besondere Ausführungsform des Kits beinhaltet mindestens 5 Primerpaare, die zur Amplifikation von 5 Loci, ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus BAT 25, BAT26, BAT40, APC, Mfd15, D2S123, D18S69 und TP53Alu., geeignet sind. Vorzugsweise besitzen diese Primer Sequenzen gemäß SEQ ID NO. 1, 2, 5, 6, 19, 20, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 45 und 46.

Eine spezielle Ausführungsform des Kits beinhaltet mindestens 5 Primerpaare zur Analyse von BAT26, BAT40, APC, Mfd15, und D2S123 nachgewiesen. Dabei können 1 oder mehrere Primerpaare Sequenzen entsprechend den SEQ ID NO. 1, 2, 5, 6, 19, 20, 33, 34, 35, 36, ... aufweisen.

Zusätzlich zu den 5 Primerpaaren können diese Kits weitere Primerpaare sowie molekularbiologische Reagenzien und Materialien enthalten, die der erfindungsgemäßen Durchführung von MTN Analysen dienen.

Als Quelle zur Gewinnung von genomischer DNA kann je nach Aufgabenstellung unterschiedliches biologisches Material analysiert werden. Für die prognostische Diagnostik sowie für die Diagnostik einer familiären Prädisposition wird dem Patienten entnommenes Tumorgewebe verwendet. Bei der Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Früherkennung von Tumoren durch Nachweis von MTN in disseminierten Tumorzellen wird die DNA aus zelluläre Bestandteile enthaltenden Körperflüssigkeiten oder Körperausscheidungen wie zum Beispiel Blut, Serum Plasma, Urin oder Stuhl isoliert.

In der Regel wird eine Kontrollreaktion mit einer DNA durchgeführt, deren Sequenz dem "gesunden" Wild-Typ des zu analysierenden Mikrosatelliten-Locus entspricht. Besonders geeignet ist genomische DNA die aus gesundem, nicht tumorigem Gewebe desselben Individuums isoliert wurde.

Die Isolierung genomischer DNA aus Formalin-gefärbtem und in Paraffin eingebettetem Gewebe erfolgt folgendermaßen:

Aufertigung von 5 µm-Schnitten mit Mikrotom, Aufziehen auf einen Objektträger

– Deparaffinierung:

Inkubation der Objektträger bei 65°C. 1 Stunde

"Durchziehen" durch Alkoholreihe: 2×15 min in Xylol

2×15 min in EtOH(abs.)

5 2×15 min in EtOH (96%)

2×15 min in EtOH (70%) (mehrere Wochen in 70% EtOH haltbar)

Überführen der Objektträger in Wasser

Abkratzen des Gewebes im feuchten Zustand mit Skalpell, Glaskapillare, o. ä. (Mikrodissektion), überführen in 0,5 ml Reaktionsgefäß

10 – Zugabe von 20–50 µl Digestion-Buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5

5% Tween 20

1 mM EDTA

Zugabe von 7–15 µl Proteinase K (20 mg/ml) (entspricht 30–50% des vorgegebenen Volumens)

15 – Inkubation bei 50°C im Thermoblock mit Heizdeckel bis Lösung klar ist (über Nacht)

– Inaktivierung der Proteinase K: 15 min 94°C.

Fakultativ kann eine weitere Aufreinigung der DNA mit dem Qiagen tissue DNA Kit der Firma Qiagen erfolgen. Zur Analyse des biologischen Materials wurden die PCR Ansätze nach folgendem Schema zusammenpipettiert:

	Master Mix		für 1		Reaktion
	µl	End konz.	Stammlösung		
H ₂ O	37,25				
DMSO	2,5	5%	100%		
10 x Expand-HiFi-Buffer (BM)	5	1 x	10 x		
dNTPs	1,0	0,2 mM	10 mM		
Primer 1:	1,0	0,3 µM	15 µM		
Primer 2:	1,0	0,3 µM	15 µM		
Taq-Pol. Expand HiFi-Pol (BM)	0,25	1,25 U	5 U		
total	48				
hinzufragen: 48µl Rk.-Mix zu 2 µl template DNA					

Alternativ wurden in einer Duplex- bzw. Multiplexanalyse auch 2 oder mehrere Loci in einem Reaktionsansatz zusammen analysiert, sofern deutlich voneinander unterscheidbare Fragmentgrößen zu erwarten waren. Dazu wurden 2 oder mehrere Primerpaare mit einer gleichen Endkonzentration von 0,3 µM je Primer eingesetzt.

Die PCR-Amplifikationen wurden unter Standardbedingungen mit 100 ng gereinigter genomischer DNA in einem MJ Research Thermocycler (PTC100, MJ Research, Watertown, MA) mit folgenden Zyklen durchgeführt:

45 94°C 3 min (einmalige Denaturierung)

35 Zyklen:

94°C 1 min

Annealingtemperatur 50–68°C. 1 min

entsprechend Abb. 1

50 72°C 1 min

72°C 8 min.

Anschließend wurden die PCR-Produkte auf einem denaturierenden, 6,7%igen Polyacrylamidgel mit 50% Harnstoff für etwa eine Stunde bei 1800 Volt und 55°C in einer SequiGen Sequenzgelkammer (BioRad, Hercules, Ca) aufgetrennt und mit Silbernitrat (Budowle et al., (1991) Am. J. Hum. Genet., 48, 137–144) in einem modifizierten Färbegrad (Bender et al., (1994) Biotechniques, 16, 204–206) angefärbt (Schlegl et al., (1995) Virchows Archiv, 426: 223–227).

Polyacrylamidgelelektrophorese zur Auftrennung der PCR Banden

60 (6,7%iges PA-6M Harnstoffgel. Vertikalapparat sequi-GenGT, BioRad)

3 µl PCR-Produkt

3 µl Loading buffer (10 ml Formamid)

10 mg Xylene Cyanol

65 10 mg Bromphenolblau

200 µl EDTA, 0,5M)

Denaturierung, 94°C, 5 min.

15 min PA-Gelvorlauf bei 2300 V (bis 55°C erreicht ist)

- Beladen des PA-Gels
- 45-75 min Aufzeit bei 180 V 55°C

Detektion der aufgetrennten PCR-Produkte durch Silberfärbung

5

Wärmeaustauschplatte vom PA-Gel (zwischen Wärmeaustauschplatte und Glasplatte) abheben und Plexiglasfärberrahmen auf das PA-Gel (an Glasplatte haftend) legen und mit Klammern fixieren.

- Zugabe von folgenden Lösungen:

- H_2O : kurz spülen
- 10% Ethanol: 10 min
- 1% Salpetersäure: 3 min
- H_2O : spülen
- 0,012 M Silbernitrat: 20 min

10

- H_2O : spülen
- 0,28 M NaCO_3 /0,019% Formalin: spülen
- 0,28 M NaCO_3 /0,019% Formalin: 3-6 min (bis Banden sichtbar)
- 10% Essigsäure: 3 min
- H_2O : 3 min

15

- Färberrahmen entfernen

- Whatmann-3MM Papier auf PA-Gel legen und damit PA-Gel von Glasplatte abziehen

20

- PA-Gel mit Frischhaltefolie bedecken und 1 h im Geltrackner (GelDryingSystem, Iorad) trocknen (so behandelte Gele sind praktisch unbegrenzt haltbar).

DNA aus 27 Patienten mit Colorektalkarzinom wurde an 25 verschiedenen MIS-Loci auf MIN untersucht. Das ausgewählte Patientenkollektiv wurde aus einer Gruppe von 200 Patienten vorselektiert, bei denen in einer früheren prospektiven Studie 5 MIS Loci analysiert worden waren (APC, D9S 171, TP 53, D13S175, D11S904). Bei diesen 27 Patienten war in 5 Fällen MIN an mindestens 2 Loci nachgewiesen worden, 5 weitere Fälle zeigten Instabilität an einem Locus und mußten daher als "lowMIN+" klassifiziert werden.

25

In 17 Fällen konnte keine Instabilität nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden eine MIS-stabile Zelllinie (SW480) und eine Zelllinie mit RER+Phänotyp (HCT116), welche einen Defekt im hMSH2 Mismatch Repair Gen aufweist, mit dem Tumormaterial verglichen.

30

Für eine detailliertere Analyse des MIN-Status dieser Tumoren wurde die MIS-Analyse auf insgesamt 25 MIS Loci ausgedehnt. Vertreter aller sechs unterschiedlichen Repeat-Typen wurden analysiert: 3 Mononukleotid-Repeat Loci (BAT 25, BAT 26, BAT 40), 6 CA-Dinukleotid-Repeats der Klasse 2a (APC, D13S175, D3S1283, Mfd26, Mfd28 und Mfd41), 8 Dinukleotid-Repeats der Klasse 2b (Mfd15, D10S197, D11S1318, D11S904, D18S69, D2S123, D9S171, TP53PCR), zwei Loci mit Trinukleotid-Repeats (AR, TBP), drei Loci mit Tetranukleotid-Repeats (IPRI, MYCL 1, RB), und zwei Loci mit Pentanukleotid-Repeats (FMR2, TP53alu). Die genauen Sequenzen dieser Repeats wurden entweder der GenBank Datenbank entnommen oder durch Direktsequenzierung von PCR-Produkten überprüft. Abb. 1 gibt einen Überblick über die analysierten Loci sowie die jeweils zur Amplifikation verwendeten Primer, deren Sequenzen in SEQ ID NOs. 1-50 wiedergegeben sind. Abb. 2a zeigt exemplarisch Amplifikationen unterschiedlicher Allele aller 25 untersuchten Genloci. Abb. 2b zeigt exemplarisch eine Duplexanalyse der Loci BAT40 und D3S1283. Bei Auftritt eines Verlustes von Allelen durch tumorbedingten Heterozygotizitäts-Verlust (loss of heterozygosity, LOH (LiMao et al., (1996), Science, 271, 659-662) wurde das Ergebnis der jeweiligen PCR in dieser Studie nicht mitberücksichtigt.

35

40

45

Identifikation von RER+ Tumoren

Um abzuklären, welche Tumoren mit Sicherheit als RER+ klassifiziert werden können und um zu untersuchen, ob einige Tumoren als "schwach RER+" eingestuft werden müssen, wurden die verschiedenen Tumoren untereinander verglichen. Nach dem Stand der Technik existiert derzeit keine einfache Methode nach dem "entweder oder" Prinzip zur eindeutigen Klassifizierung eines Tumors als RER+ oder RER-. Das vorselektierte Kollektiv von 27 Colorektaltumorpacienten, von denen ursprünglich 17 als RER-, 5 als RER+ und 5 als "lowMIN+" diagnostiziert wurden, ergab nach Analyse weiterer Loci ein wesentlich differenziertes Bild bezüglich der Verteilung von MIN.

50

Wie in den Abb. 3 und 4a dargestellt, konnten 3 Tumoren mit einer MIN-Rate von mehr als 50% (14MIN/24 Loci, Nr. 1, 8 und 16), ein Tumor mit 42% (10MIN/24 Loci, Nr. 5), ein Tumor mit 38% (9MIN/24 Loci, Nr. 2) und ein Tumor mit 29% (7MIN/24 Loci, Nr. 13) nachgewiesen werden. Damit besitzen all diese Tumoren als gemeinsames Kriterium eine Instabilitätsfrequenz von über 25% der analysierten Loci. Deshalb wurden diese insgesamt 6/27 Tumoren als eindeutig RER+ klassifiziert.

55

Darüber hinaus wurden 8 zusätzliche Tumoren identifiziert, die 1 bis 2 MIN-Ereignisse aufwiesen (n=8, MIN-Frequenz $\leq 8\%$) und daher als "lowMIN+" klassifiziert wurden. Im Vergleich zu der früheren Studie, bei der nur 5 anstatt 25 MIS Loci analysiert wurden, konnten durch die neue Studie nur 13 anstatt vorher 17 Fälle als RER- klassifiziert werden. Dieses Ergebnis, erzielt durch eine Ausweitung der Analyse auf 25 MIS-Loci, unterscheidet sich damit grundlegend von früheren Studien nach dem Stand der Technik und verdeutlicht das Problem einer unzuverlässigen RER-Klassifikation, wenn für eine solche Klassifikation eine kleine Anzahl an MIS Loci zufällig ausgewählt wird. In diesem Zusammenhang ist allerdings von besonderer Bedeutung, daß kein Tumor mit einer mittleren Instabilität an 3 bis 6 Loci entsprechend einem Prozentsatz von 10-25% nachgewiesen werden konnte, so daß bei einer MIN Rate von über 25% eine RER+ Klassifikation eindeutig vorgenommen werden kann.

60

65

Unterschiedliche MIS Loci zeigen unterschiedliche MIN-Häufigkeiten

Insgesamt waren in 14 der 27 untersuchten Tumoren Mikrosatelliten von Instabilität betroffen. Wie erwartet, trat MIN dabei in einigen Tumoren vermehrt auf; zusätzlich wurden jedoch auch einzelne Ereignisse an MIN in weiteren Tumoren nachgewiesen. Um zu ermitteln, ob MIN-Häufigkeit vom Repeat-Typus abhängt, wurden die MIN-Frequenzen für jeden Repeat-Typ separat ermittelt und mit der durchschnittlichen MIN-Frequenz der Gesamtheit der getesteten Mikrosatelliten verglichen: Die durchschnittliche MIN-Rate bezogen auf alle pro Patient untersuchten Loci betrug 11,4% (78 MINS/25Loci=3,1 MINS/Locus; durchschnittliche MIN Rate = 3,1/27 Patienten 11,4%). Die durchschnittlichen Frequenzen innerhalb der einzelnen Repeat-Typen waren dagegen unterschiedlich: sämtliche Mononukleotid-Repeats waren überdurchschnittlich oft verändert (5,0 MINS/27 Patienten = 18,5% = + 7,1%); alle anderen Repeat Typen waren seltener als die Mononukleotid Repeats betroffen. Sowohl die MIN Raten von komplexen Dinukleotid-Loci als auch von nicht komplexen Dinukleotid Loci unterschieden sich nicht signifikant von dem für die Gesamtheit aller Loci bestimmten Mittelwert (0,3 bzw. 0,9%). Ähnliches gilt für die Tetranukleotid-Repeats (+1,4%), die allerdings bezogen auf den jeweils einzelnen Locus eine starke Heterogenität aufweisen (-11,4% bis +14,5%). Erhöhte MIN Frequenz wurde für beide Trinukleotid Repeats ermittelt (+3,4%). Pentanukleotid Repeats zeigten dagegen unterdurchschnittliche MIN Frequenzen (-4,0%). An einem Locus dieses Typs (FMR2) wurde überhaupt keine MIN nachgewiesen. Daraus folgt, daß die Bestimmung der Frequenz von MIN-Ereignissen dramatisch von der Auswahl der analysierten Loci abhängig ist.

Bestimmte MIS Loci sind häufiger spezifisch in RER+ Tumoren verändert

Deshalb ist für die Analyse des MIN Status von Bedeutung, ob es bestimmte Loci gibt, die spezifisch und regelmäßig in RER+ Tumoren von MIN betroffen sind. Ein einheitliches Ergebnis wurde diesbezüglich nur bei MIS mit Mononukleotid Repeats erzielt (BAT 25, BAT 26, BAT 40). Jeder dieser Loci war in den gleichen 5 RER+ Tumoren verändert (Nrs. 1, 2, 8, 13, 16), aber keiner wies MIN in RER- Tumoren oder "lowMin" Tumoren auf. Im Gegensatz dazu waren bis auf Mfd15 alle anderen getesteten Loci entweder weniger oft in den RER+ Tumoren mutiert oder zusätzlich in "lowMIN" Tumoren verändert. Beispielsweise konnte für den APC Locus nicht nur in allen RER+ Tumoren, sondern auch in Tumor Nr. 20 MIS nachgewiesen werden. Fünf Loci zeigten MINS in 4/6 RER+ Tumoren, aber nur D2S123 war in Nicht-RER+ Tumoren unverändert. Im Gegensatz dazu zeigte Locus MYCL1, der ebenfalls in 4/6 RER+ Tumoren verändert war, zusätzlich Instabilitäten in 3 "lowMIN" Tumoren, so daß beispielsweise dieser Locus als Marker ungeeignet ist.

Daher erfordert eine Beschränkung auf 5 Marker zur Analyse von Mikrosatelliteninstabilität eine gezielte Auswahl der Loci so daß dennoch gewährleistet ist, daß die Zahl der nicht eindeutig zu klassifizierenden lowMIN+ Fälle minimiert wird und alle RER+ Träger mit einem höchst möglichen Maß an Wahrscheinlichkeit identifiziert werden können.

Kurze Beschreibung der Abbildungen

Abb. 1 zeigt eine Tabelle mit den wichtigsten Kennzeichen der analysierten MIS Loci (Locussymbol Markemarc, chromosomale Lokalisation, Repeat-Typ) sowie den Parametern für die jeweilige PCR-Amplifikation (PCR-Tm: Hybridisierungstemperatur).

Abb. 2a zeigt die gelelektrophoretische Analyse von 25 untersuchten Mikrosatelliten Loci. Die verschiedenen Allele der erfindungsgemäß zu analysierenden Loci BAT26, BAT40, APC, MID15, D2S123 und TP53Alu lassen sich deutlich voneinander unterscheiden. **Abb. 2b** zeigt exemplarisch eine Duplexanalyse der Loci BAT40 und D3S1283 in einem Reaktionsansatz.

Abb. 3 stellt das Ergebnis der durchgeführten Studie in einer Übersicht dar. 27 Patienten mit Colorektaltumoren wurden auf MIN an 25 verschiedenen Allelen untersucht. Das Ergebnis zeigt, daß (i) unterschiedliche MIS in unterschiedlicher Häufigkeit von polymorphen Veränderungen betroffen sind und (ii) in unterschiedlichen Patienten verschiedene Klassen von Mikrosatelliten mit unterschiedlicher Häufigkeit von genomischer Instabilität betroffen sind.

Abb. 4 klassifiziert die Tumoren aus dem untersuchten Patientenkollektiv von 27 Personen nach der Anzahl der ermittelten MIN Ereignisse.

Abb. 4a repräsentiert die Auswertung aller 25 MIS. Die Verteilung zeigt, daß eine Gruppe von 6 Patienten existiert, bei denen MIN häufiger als 7 mal auftritt, so daß dieser Klasse eindeutig der Phänotyp RER+ zugeordnet werden kann. Darüber hinaus existiert eine Gruppe von 8 Patienten, bei denen 1 oder 2 MIN nachgewiesen wurden und die damit als "lowMIN+" zu klassifizieren sind.

Abb. 4b repräsentiert die erfindungsgemäße Analyse von 5 ausgewählten MIS wie in Beispiel 1 beschrieben. Diese Analyse führt ebenfalls zu einer Verteilung, aufgrund derer eine eindeutige Entscheidung über den RER+ Phänotyp getroffen werden kann. Nur 2 Patienten (Nr. 7, TP53 Alu Locus und Nr. 20, APC Locus) müssen nach diesem Verfahren als lowMIN+ klassifiziert werden.

Abb. 4c repräsentiert die Analyse einer anderen erfindungsgemäßen Auswahl von 5 MIS gemäß Beispiel 2, die mit einer Ausnahme (APC, Patient 20) ebenfalls eine eindeutige Klassifikation des RER Phänotyps ermöglicht.

Abb. 5 zeigt Geburtsdatum Alter und klinische Daten zum untersuchten Patientenkollektiv, Stand August 1994. (T, N, M: Tumorklassifikation, G: Grade, I.O.K: Tumorklassifikation, re: Colon rechts, li: Colon links, R: Rectum).

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter:

Beispiel 1: Auswahl von 2 Mononukleotid-Repeat Loci, 1 Dinukleotid-Repeat-Locus der Klasse 2a, 1 Dinukleotid Locus der Klasse 2b und 1 Pentanukleotid-Repeat Locus

Wie die Studie zeigte, ergaben sich bei der Verwendung von Mononukleotid Repeat Loci zur Bestimmung RER+ Phänotyps keine falsch-positiven Resultate, so daß eine Analyse dieser Loci besonders geeignet erschien. Andererseits

konnten nicht alle RER+ Tumoren durch die Analyse von Mononukleotid Repeat Loci nachgewiesen werden. So war beispielsweise Tumor Nr. 5 eindeutig RER+, wies aber keine Instabilität bezüglich der Loci BAT2S, BAT26 und BAT40 auf, obwohl MIN an 9 Loci mit anderen Repeat Typen nachgewiesen werden konnten. Es ergab sich daher die Notwendigkeit, für eine möglichst exakte Bestimmung des RER Phänotyps bei einer begrenzten Anzahl von 5 analysierten Loci eine Kombination aus verschiedenen Repeat Typen auszuwählen. Dadurch wird gewährleistet, daß trotz der geringen Zahl an analysierten Loci einerseits alle RER+ Träger mit einem höchst möglichen Maß an Wahrscheinlichkeit identifiziert werden können und andererseits die Zahl der nicht eindeutig zu klassifizierenden lowMIN+ Fälle soweit wie möglich minimiert wird.

Aufgrund der durch die Studie mit 27 Tumoren ermittelten Häufigkeiten wurden zur Bestimmung des Phänotyps folgende Kriterien festgelegt: bei mindestens 2 MIS-positiven Loci sollte von einem RER+ Phänotyp ausgegangen werden, bei keinem positiven Nachweis von MIS sollte von einem RER- Phänotyp ausgegangen werden. Der Nachweis von genau einem MIN Ereignis wurde als "low MIN+" definiert. (Letzteres erfordert im Zweifelsfalle die Analyse weiterer MIS Loci.)

Die Auswertung der 27 Tumoren bezüglich der erfindungsgemäß ausgewählten Loci BAT 26, BAT 40, APC, Mfd15, TPS3Alu nach diesem Verfahren führte zu dem in Abb. 4b dargestellten Ergebnis. Für alle 6 Tumoren die durch die Analyse von 25 Loci als RER+ klassifiziert worden waren, wurde eine Häufigkeit von mindestens drei MIN Ereignissen bestimmt. Somit wurden diese Tumoren auch durch die Analyse der 5 ausgewählten Loci als RER+ klassifiziert. Nur zwei Tumoren (Nr. 7, Nr. 20) wurden nach diesem Verfahren als "lowMIN+" klassifiziert und sind somit nicht eindeutig zu interpretieren.

Beispiel 2: Auswahl von 2 Mononukleotid-Repeat Loci, 1 Dinukleotid-Repeat-Locus der Klasse 2a und 2 Dinukleotid Loci der Klasse 2b

Die Auswertung der 27 Tumoren erfolgte nach dem gleichen Verfahren wie in Beispiel 1, jedoch mit einer modifizierten, ebenfalls erfindungsgemäßen MIS-Auswahl (BAT 26, BAT 40, APC, Mfd15 und D18S69). Das Ergebnis ist in Abb. 4c dargestellt. Sämtliche Tumoren mit RER+ Phänotyp waren in mindestens drei der ausgewählten Loci verändert. Somit konnten auch durch diese Auswahl an Loci alle 6 bekannten RER+ Tumoren eindeutig als RER+ identifiziert werden. Nur ein Tumor wurde in diesem Falle als "lowMIN+" und damit als nicht eindeutig interpretierbar klassifiziert.

Beispiel 3: Bestimmung des RER Phänotyps als prognostischer Indikator

Zum Nachweis der Eignung einer erfindungsgemäßen Auswahl von 5 Loci zur Bestimmung des RER Phänotyps wurden die in Abb. 5 tabellarisch enthaltenen klinischen Daten mit den Ergebnissen der MIN Analyse aus Beispiel 1 verglichen. Wie in diesem Beispiel offenbart, führte die Analyse der getesteten Loci zum Nachweis von RER+ bei 6 von insgesamt 27 untersuchten Tumorpacienten. Nur 2 von 6 (33%) dieser RER+ Patienten waren zum Abschluß der Studie verstorben. Beide wären zu diesem Zeitpunkt über 80 Jahre alt. Im Gegensatz dazu waren bereits 8 von 19 (42%) der in Beispiel 1 als RER- klassifizierten Patienten verstorben. Ihr Altersdurchschnitt hätte zum Zeitpunkt der Studie 64 Jahre betragen. Daraus ist ersichtlich, daß eine erfindungsgemäße Analyse von 5 Mikrosatelliten Loci eine prognostische Aussage über den Verlauf der Tumorerkrankung ermöglicht.

DE 197 12 332 A 1

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH
- (B) STRASSE: Sandhoferstr. 116
- (C) ORT: Mannheim
- (E) LAND: DE
- (F) POSTLEITZAHL: 68305
- (G) TELEFON: 06217591456
- (H) TELEFAX: 06217594457

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zum Nachweis von Mikrosatelliten-Instabilitaet zur Tumordiagnostik

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 50

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

AAACAGGATG CCTGCCTTTA

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GGACTTTCCA CCTATGGGAC

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 22 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid

DE 197 12 332 A 1

(C) STRANGFORM: Einzelstrang		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA		5
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:		
GGCAGTACCA CCTGTAGAAA TC	22	10
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:		
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:		15
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare		
(B) ART: Nucleotid		
(C) STRANGFORM: Einzelstrang		
(D) TOPOLOGIE: linear		20
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA		
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:		25
GAGTAACAGA GGCATCGTGT ATTG	24	
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:		30
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:		
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare		
(B) ART: Nucleotid		
(C) STRANGFORM: Einzelstrang		35
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA		40
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:		
ACTCACTCTA GTGATAAATC G	21	
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:		45
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:		
(A) LÄNGE: 25 Basenpaare		50
(B) ART: Nucleotid		
(C) STRANGFORM: Einzelstrang		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA		55
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:		
AGCAGATAAG ACAGTATTAC TAGTT	25	60
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:		
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:		65
(A) LÄNGE: 25 Basenpaare		
(B) ART: Nucleotid		

DE 197 12 332 A 1

- 4C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

5 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

10 AGCTAAGTGA ACCTCATCTC TGTCT

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

15 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

20 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

ACCCTAGCAC TGATGGTATA GTCT

24

30 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 21 Basenpaare

35 (B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

40 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

AACACTAGTG ACATTATTTT C

21

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

50 (A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

55 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

60 AGCTAGGCCT GAAGGCTTCT

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

65

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

DE 197 12 332 A 1

· 4C) STRANGFORM: Einzelstrang		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA		5
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:		
ACCACTGCAC TTCAGGTGAC	20	10
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:		
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:		15
(A) LÄNGE: 22 Basenpaare		
(B) ART: Nucleotid		
(C) STRANGFORM: Einzelstrang		
(D) TOPOLOGIE: linear		20
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA		
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:		25
GTGATACTGT CCTCAGGTCT CC	22	
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:		30
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:		
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare		
(B) ART: Nucleotid		
(C) STRANGFORM: Einzelstrang		35
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA		
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:		40
ATGACAAGCA ATCCTTGAGC	20	
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:		45
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:		
(A) LÄNGE: 25 Basenpaare		
(B) ART: Nucleotid		50
(C) STRANGFORM: Einzelstrang		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA		55
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:		
CTGTGTTATA TCCCTAAAGT GGTGA	25	60
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:		
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:		65
(A) LÄNGE: 16 Basenpaare		
(B) ART: Nucleotid		

DE 197 12 332 A 1

(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

5 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

10 CCCGTATGGC AACAGG 16

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

15 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 17 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
20 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

25 TGTGCATGTC ATGAGTG 17

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 22 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
35 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
40 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

TATTGGATAC TTGAATCTGC TG 22

45 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
50 (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

55 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

60 TGCATCACCT CACATAGGTT A 21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

65 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid

DE 197 12 332 A 1

(C) STRANGFORM: Einzelstrang		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA		5
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:		
GGAAGAATCA AATAGACAAT	20	10
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:		
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:		15
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare		
(B) ART: Nucleotid		
(C) STRANGFORM: Einzelstrang		
(D) TOPOLOGIE: linear		20
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA		
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:		25
GCTGGCCATA TATATATTTA AACC	24	
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:		30
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:		
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare		
(B) ART: Nucleotid		
(C) STRANGFORM: Einzelstrang		35
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA		
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:		40
CAGGTTCTGT CATAGGACTA		
20		45
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:		
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:		50
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare		
(B) ART: Nucleotid		
(C) STRANGFORM: Einzelstrang		
(D) TOPOLOGIE: linear		55
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA		
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:		
TTCTGGAAAC CTACTCCTGA	20	60
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:		65
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:		
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare		

DE 197 12 332 A 1

(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

10

CAGAAAATTC TCTCTGGCTA

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

15

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

20

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

CTCATGTTCC TGGCAAGAAT

20

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 16 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

35

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

GCTCCCGGCT GGTTTT

45

16

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

50

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

60

GCAGGAAATC GCAGGAACCT

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:

65

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

DE 197 12 332 A 1

(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

CTCTTTCTCT GACTCTGACC 20 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear 20 15

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

GACTTTCTAA GTTCTTGCCA G 21 25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 26 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear 30 35

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA 40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

AGCGCAGCAC CTCCCGGCGC CAGTTT 26 45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 30:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear 50 55

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

GCTGCTGCTG CCTGGGGCTA GTCTCTT 27 60

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 31:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare 65

DE 197 12 332 A 1

(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

5 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:

10 TCGCCTCCAA GAATGTAAGT 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 32:

15 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

20 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32:

TCTGCATTTT AACTATGGCT C 21

30 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 33:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

35 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 33:

40 TGACTACTTT TGACTTCAGC C 21

45 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 34:

50 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 22 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

55 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 34:

60 AACCATTCAA CATTTTTAAC CC 22

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 35:

65 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare

DE 197 12 332 A 1

- (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA 5
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 35:
- ATTAACCTCC TACACCACAA C 21 10
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 36:
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN: 15
 - (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear 20
 - (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 36: 25
 - GTAGAGCAAG ACCACCTTG 19
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 37: 30
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid 35
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA 40
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 37:
 - CGGTTATCCC AGTTCGGCCT CTCTGGGAT 29 45
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 38:
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN: 50
 - (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear 55
 - (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 38:
 - TCCACCTCCC GCTCAGTCAG ACTGCGCT 28 60
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 39:
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN: 65
 - (A) LÄNGE: 32 Basenpaare

DE 197 12 332 A 1

(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 39:

10

GCAGCTATAA TGACTAGAAT GAAGTCCTAC TG

32

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 40:

15

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 36 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

20

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

25

30

35

40

45

50

55

60

65

DE 197 12 332 A 1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 40:	
TTGAATTAAA GACTTGTTTA AACACAAAT TTAGAC	36
	5
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 41:	
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
(A) LÄNGE: 19 Basenpaare	10
(B) ART: Nucleotid	
(C) STRANGFORM: Einzelstrang	
(D) TOPOLOGIE: linear	15
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA	
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 41:	
TGGCGAGACT CCATCAAAG	19
	20
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 42:	
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
(A) LÄNGE: 22 Basenpaare	25
(B) ART: Nucleotid	
(C) STRANGFORM: Einzelstrang	30
(D) TOPOLOGIE: linear	
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA	
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 42:	35
CTTTTTTAAGC TGCAACAATT TC	22
	40
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 43:	
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
(A) LÄNGE: 19 Basenpaare	
(B) ART: Nucleotid	45
(C) STRANGFORM: Einzelstrang	
(D) TOPOLOGIE: linear	
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA	50
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 43:	
CTCCTCCCTA CTTACTTGT	19
	55
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 44:	
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
(A) LÄNGE: 19 Basenpaare	60
(B) ART: Nucleotid	
(C) STRANGFORM: Einzelstrang	
(D) TOPOLOGIE: linear	65
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA	

DE 197 12 332 A 1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 44:

AATTAACAAG GTGTGGTGG

19

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 45:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 45:

GCACTTTCCT CAACTCTACA

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 46:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 46:

AACAGCTCCT TTAATGGCAG

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 47:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 47:

AGGGATACTA TTCAGCCCCGA GGTG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 48:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 22 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi). SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 48:

ACTGCCACTC CTTGCCCCAT TC

22

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 49:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

10

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 49:

CCCACAGCCT ATTCAGAACA C

21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 50:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

25

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 50:

35

GTTGACTGCT GAACGGCTGC

20

Patentansprüche

40

1. Verfahren zur Analyse von Mikrosatelliten-Loci, bestehend aus folgenden Schritten:
 - a) Isolierung von genomischer DNA aus humanem biologischem Material;
 - b) DNA-Amplifikation von 5 verschiedenen Mikrosatelliten-Loci der DNA mit Hilfe von jeweils fünf verschiedenen Primerpaaren, wobei es sich bei den zu amplifizierenden Loci um zwei Mononukleotid-Repeat Loci, ein oder zwei Dinukleotid-Repeat-Loci der Klasse 2a, ein oder zwei Dinukleotid-Repeat-Loci der Klasse 2b und gegebenenfalls ein Pentanukleotid-Repeat Locus handelt;
 - c) Größenbestimmung der Amplifikationsprodukte.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die 5 Mikrosatelliten-Loci ausgewählt werden aus einer Gruppe von Loci bestehend aus: BAT 25, BAT26, BAT40, APC, MFD15, D2S123, D18S69 und TP53A1u.
3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens 1 Primerpaar ausgewählt wird aus einer Gruppe von Primern repräsentiert durch SEQ ID NOS. 1, 2, 5, 6, 19, 20, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 45 und 46.
4. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die 5 Mikrosatelliten-Loci: BAT26, BAT40, APC, Mfd15 und D2S123 analysiert werden.
5. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens 1 Primerpaar ausgewählt wird aus einer Gruppe von Primern repräsentiert durch SEQ ID NOS. 1, 2, 5, 6, 19, 20, 33, 34, 35, und 36.
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1-5 zur Bestimmung des RLR Phänotyps, dadurch gekennzeichnet, daß bei fehlendem Nachweis von Mikrosatelliten-Instabilität bei allen 5 untersuchten Loci von einem RHR Phänotyp und bei Nachweis von Mikrosatelliten-Instabilität bei mehr als einem Locus von einem RHR+ Phänotyp ausgegangen wird.
7. Verwendung eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1-6 zur prognostischen Tumordiagnose.
8. Verwendung eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1-6 zur Diagnose von familiärer Tumorerkrankung.
9. Verwendung gemäß Anspruch 7 oder 8 zur Indikation von Tumoren des Gastrointestinalsystems und des Endometrium.
10. Verwendung gemäß Anspruch 9 zur Indikation von Colorektalkarzinomen.
11. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1-6 zur Früherkennung von Tumoren durch Nachweis von Mikrosatelliten-Instabilität.

45

50

55

60

65

teliten Instabilität in disseminierten Tumorzellen.

12. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1-6 zur Therapieentscheidung.

13. Kit zur tumordiagnostischen Analyse von Mikrosatelliten-Instabilität, mindestens bestehend aus 5 Primer-Paaren, welche zur DNA-Amplifikation von zwei Mononukleotid-Repeat Loci, ein oder zwei Dinukleotid-Repeat-Loci der Klasse 2a, ein oder zwei Dinukleotid-Repeat-Loci der Klasse 2b und gegebenenfalls einem Pentanukleotid-Repeat Locus geeignet sind.

14. Kit zur tumordiagnostischen Analyse von Mikrosatelliten-Instabilität, bestehend aus 5 Primer-Paaren, welche zur DNA-Amplifikation von 5 Loci, ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus BAT 25, BAT26, BAT40, APC, MFD15, D2S123, D18S69 und TP53Alu, geeignet sind.

15. Kit zur tumordiagnostischen Analyse von Mikrosatelliten-Instabilität, bestehend aus 5 Primer-Paaren, von denen mindestens 1 Primerpaar ausgewählt wird aus einer Gruppe von Primern repräsentiert durch SEQ ID NOs. 1, 2, 5, 6, 19, 20, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 45 und 46.

16. Kit gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß 5 Primer-Paare enthalten sind, welche zur DNA-Amplifikation von BAT26, BAT40, APC, Mfd15, und D2S123 geeignet sind.

17. Kit gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, mindestens 1 Primerpaar enthalten ist, welches ausgewählt wird aus einer Gruppe von Primern repräsentiert durch SEQ ID NOs. 1, 2, 5, 6, 19, 20, 33, 34, 35, und 36.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Locus/symbol	PCR-1m	Seq ID NO	Markers/noms	Chrom. loc.	Primersequenz	Motif	Fragmentlänge (bp)	Reference
D2S123 f	60°	1	AFM034h3	2p16	AAA CAG GAT GGC TGC CTT TA	CA	187-227	Weissenbach, J Nature 359:794-801 1992
D3S1283 f	60	3	AFM183yc3	3p24.2/22	GGA CTT TCC ACC TAT GGG AC	CA	150-160	Weissenbach, J Nature 359:794-801 1992
D3S1283 r	65°	4			GAG TAA CAG AGC CAT GGT GTA TTC	CA	98-122	Spillo, L.
D3S348 f	60°	5	LHG-CA1	6q21/22	AGT CAG TCT AGT GAT AAA TCG	CA	159-177	Nucl. Acids Res. 19:6348 1991
D3S348 r	60°	6	(APC)		AGC TAA GTG AAC GTG ATG TCT GTC T	CA	159-177	Weissenbach, J Nature 359:794-801 1992
D3S171 CA	60°	7	AFM186cc3a	9p21	AGC AGA TAA GAC AGT ATT ACT AGT T	CA	142-156	Weber, J.L.
D3S171 GT	65°	8			AGC CTA GCA GTG ATG GTA TAG TCT	CA	181-173	Nucl. Acids Res. 19:637 1990
D1S686 s	65°	9	Md28CA	10p16	AAC ACT AGT GAG ATT ATT TTC	CA	185-201	Weissenbach, J Nature 359:794-801 1992
D1S686 s	65°	10			AGC TAG GCC TGA AGG GTT CT	CA	ca 130	Gyapay, G.
D1S686 s	65°	11	AFM190h12a	10q16	AGC ACT GCA CTT CAG GTG AC	CA	101-113	Nature Genet. 7:246-338 1994
D1S686 s	65°	12			GTG ATA CTG TCC TCA GGT GTC C	CA	ca 150	Weissenbach, J Nature 359:794-801 1992
D1S686 s	65°	13	AFM0812a5	11p14/13	ATG ACA AGC AAT CCT TGA GC	CA	157-171	Weissenbach, J Nature 359:794-801 1992
D1S686 s	65°	14			CTG TGT TAT ATC CCT AAA GTG GTG A	CA	103-119	Straub, R.E.
D1S1318 f	60°	15	AFM210w1a	11p15.5	CCC GTA TGG CAA CAG G	CA	144-180	Genomics 15:48-58 1993
D1S1318 r	60°	16			TCT GCA TGT NCA TGA GTG	CA	ca 110	Dib, C Nature 360:153-154, 1986
D1S1318 r	60°	17	AFM248h1b	13q11	TAT TGG ATA GTT GAA TCT GCT G	CA	ca 110	Weissenbach, J Nature 359:794-801 1992
D1S1318 r	60°	18			TCC ATC ACC TCA CAT AGG TTA	CA	ca 150	Weber, J.L. et al.
D1S1318 r	60°	19	Md15CA	17q11.2-q12	GGA AGA ATC AAA TAG ACA AT	CA	157-171	Nucl. Acids Res. 18:4840 1990
D1S1318 r	60°	20			GCT GGC CAT ATA TAT ATT TAA ACC	CA	103-119	Weber, J.L. et al.
D1S1318 r	60°	21	Wd41	17p12-11.1	CAG GTT CTG TCA TAG GAC TA	CA	144-180	Genomics 15:48-58 1993
D1S1318 r	60°	22			TTC TGG AAA CCG ACT CCT GA	CA	ca 110	Weissenbach, J Nature 359:794-801 1992
D1S1318 r	60°	23	Md26CA	18q12	CAG AAA ATT CTC TCT GGC TA	CA	157-171	Nucl. Acids Res. 18:4840 1990
D1S1318 r	60°	24			CTC ATG TTC CTG CGA AGA AT	CA	103-119	Straub, R.E.
D1S1318 r	60°	25	AFM164w31a	18q23.3	GCAGGAGCTGGCTTTT	CA	144-180	Genomics 15:48-58 1993
D1S1318 r	60°	26			GCAGGAGCTGGCTTTT	CA	ca 110	Weissenbach, J Nature 359:794-801 1992
D1S1318 r	60°	27	AFM240y1	18q21	CTC TTT CTC TGA CTC TGA CC	CA	ca 125	Nature 359:794-801 1992
D1S1318 r	60°	28	AR 234f	Xcen-q13	GAC TTT CTA AGT TCT TGC CAG	CA	ca 80	Papadopoulos, N. et al.
D1S1318 r	60°	29	AR 235f		AGG GCA GCA CCG CGC GGC AGT TT	CA	ca 80-100	Science 268:1915-1917
D1S1318 r	60°	30	BAT-25f	4q12	TGC CCG TCC CCA AGA ATG TAA GT	A25	ca 60-100	Papadopoulos, N. et al.
D1S1318 r	60°	31	BAT-25f		TCT GCA TTT TAA CTATGG CTC	A26	ca 60-100	Science 268:1915-1917
D1S1318 r	60°	32	BAT-26f	2p	TGA CTA CTT TTG AGT TCA GCC	A40	172	persönliche Mitteilung von Dr. Richard Fischel
D1S1318 r	60°	33	BAT-26f		AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C	CA	151-163	Research Genetics (Huntsville, AL)
D1S1318 r	60°	34	BAT-40f	1p13.1	ATT AAC TTC CTA CAC CAC AAC	CA	140-209	Makela, T.P. et al.
D1S1318 r	60°	35	BAT-40f		GTA GAG CAA GAG CAG GTT G	CA	260-300	Huht M.J. Genet. 12:17 1992
D1S1318 r	60°	36	FMK2 u	X	CAG TTA TCC CAG TTC GGC CTC TCT GGG AT	CA	ca 400	Huang, Cancer res 52:8525, 1992
D1S1318 r	60°	37	FMK2 u		TCC ACC TCC CGC TCA GTC AGA CTG GGC T	CA	103-135	Fuhtel, Nucl. Acids Res. 19:6877, 1991
D1S1318 r	60°	38	FMK2 u		TTG AAT TAA AGA CTT GTT TAA ACA CAA AAT TTA GAC	CA	165-206	Genes Chromosom. Cancer 5:80-90 1992
D1S1318 r	60°	39	HPRT1 u	Xq28	GCA CCG ATA ATG ACT AGA ATG AAG TCC TAC TG	CA	103-135	Polymorphisms et al., Nucl. Acids Res. 19:4307 1991
D1S1318 r	60°	40	HPRT1 u		TTG AAT TAA AGA CTT GTT TAA ACA CAA AAT TTA GAC	CA	103-135	Polymorphisms et al., Nucl. Acids Res. 19:4307 1991
D1S1318 r	60°	41	MYCL1-U	1p32	TGG CGA GAC TCC ATC AAA G	CA	103-135	Polymorphisms et al., Nucl. Acids Res. 19:4307 1991
D1S1318 r	60°	42	MYCL1-U		GTT TTT AAG CTG CCA CAA TTG	CA	103-135	Polymorphisms et al., Nucl. Acids Res. 19:4307 1991
D1S1318 r	60°	43	RB-U	13q14	CTG CTC CCG ACT TAC TTG T	CA	103-135	Polymorphisms et al., Nucl. Acids Res. 19:4307 1991
D1S1318 r	60°	44	RB-U		AAT TAA CAA GGT GTG GTG G	CA	103-135	Polymorphisms et al., Nucl. Acids Res. 19:4307 1991
D1S1318 r	60°	45	1p53Aur f	17p13.1	GGA CTT TCC TCA AGT GTA CA	CA	103-135	Polymorphisms et al., Nucl. Acids Res. 19:4307 1991
D1S1318 r	60°	46	1p53Aur f		AAC AGC TCC TTT AAT GGC AG	CA	103-135	Polymorphisms et al., Nucl. Acids Res. 19:4307 1991
D1S1318 r	60°	47	TP53.PCR15.1	17p13.1	AGG GAT ACT ATT CAG CCG GAG GTG	CA	103-135	Polymorphisms et al., Nucl. Acids Res. 19:4307 1991
D1S1318 r	60°	48	TBP-u	8q27	ACT GCG ACT GCT TCG CCG ATT C	CA	103-135	Polymorphisms et al., Nucl. Acids Res. 19:4307 1991
D1S1318 r	60°	49	TBP-u		GCG AGA GCG TAT TGA GAA CAG	CA	103-135	Polymorphisms et al., Nucl. Acids Res. 19:4307 1991
D1S1318 r	60°	50	TBP-u		GTT GAC TGC TGA AGC GCT GC	CA	103-135	Polymorphisms et al., Nucl. Acids Res. 19:4307 1991

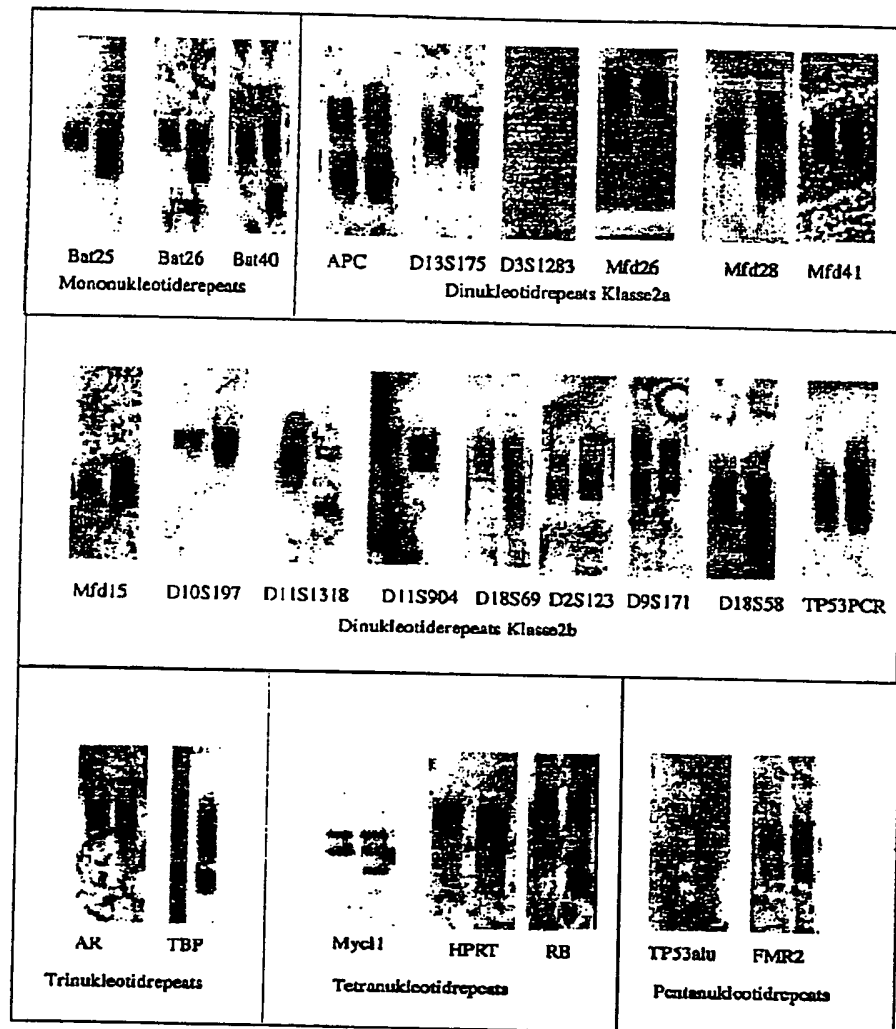


Abb. 2a

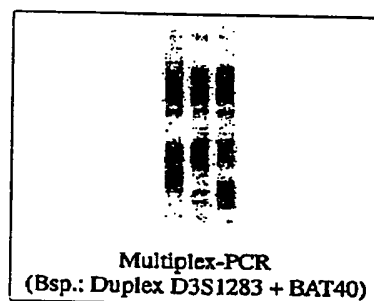


Abb. 2b

Nummer:
Int. Cl. 6:
Offenlegungstag:

DE 197 12 332 A1
C 12 Q 1/68
1. Oktober 1998

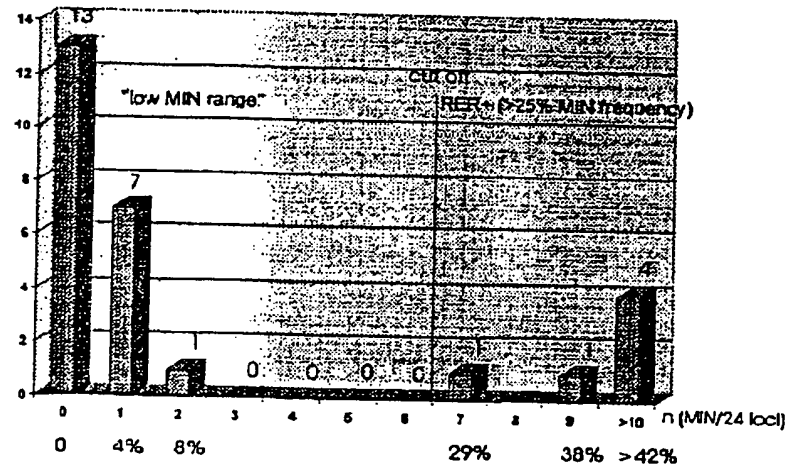
		Tumorpatient																										
Repeats	MIS locus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Mono	BAT25	•	•						•					•			•											
	BAT26	•	•						•					•			•											
	BAT40	•	•						•					•			•											
D1 Klasse 2a	APC	•	•		•			•	•				•			•	•		•									
	D1S175								•								•											
	D3S1283								•								•											
	Mfd26	•															•											
	Mfd28		•						•						•		•											
D1 Klasse 2b	Mfd11																											
	Mfd15	•	•											•			•											
	D10S197	•	•						•								•											
	D11S1318																											
	D11S904																											
	D18S69			•					•								•											
	D2S123		•						•								•											
	D9S171		•						•								•											
	D18S58		•						•								•											
	TP53PCR								•					•			•											
Tri	AR	•	•						•								•		•								•	
	TBP	•	•						•								•		•									
Tetra	HPRT																											
	MYCL1								•					•			•		•									
	RB								•					•			•		•									
Penta	FMR2																											
	TP53Alu	•							•								•											

•: MIN

Abb. 3

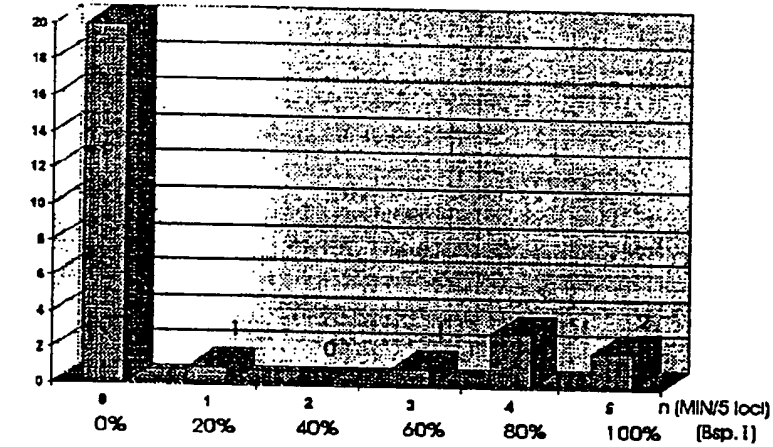
n (tumors)

Abb. 4a



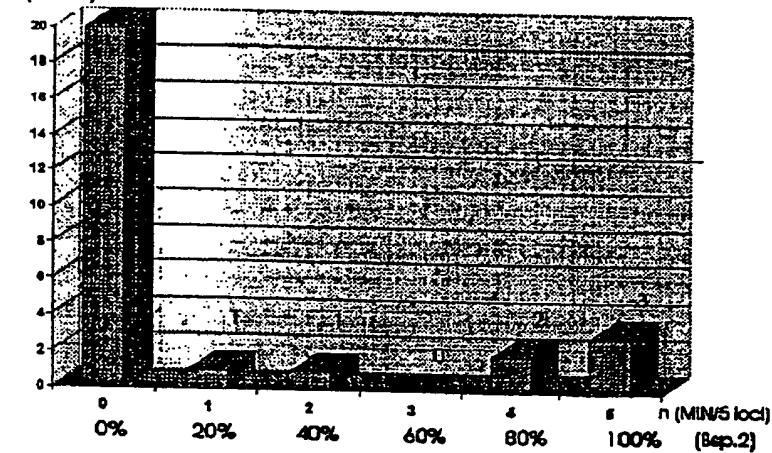
n (tumors) 20

Abb. 4b



n (tumors) 20

Abb. 4c



Patient	GEB	AGE	lebt	T	N	M	G	LOK	Klass. Bsp1
1	22.02.12	80	nein	4	3	X	3	re	RER+
2	23.01.49	44	ja	3	0	0	2	re	RER+
3	10.09.28	64	ja	2	0	0	2	R	RER-
4	09.02.19	74	ja	2	0	0	2	re	RER-
5	20.08.28	64	ja	3	1	X	3	R	RER+
6	04.06.29	64	nein	4	0	0	3	R	RER-
7	15.06.37	56	ja	3	0	1	2	R	lowMin+
8	25.11.24	70	ja	2	1	0	3	re	RER+
9	31.07.19	74	nein	4	0	0	3	R	RER-
10	22.06.29	64	nein	3	2	0	2	li	RER-
11	31.03.41	52	ja	0	0	0	2	R	RER-
12	30.04.46	47	ja	3	1	0	2	R	RER-
13	13.08.36	57	ja	3	1	0	3	re	RER+
14	03.09.28	65	ja	3	0	0	2	R	RER-
15	14.07.34	59	ja	1	0	0	2	R	RER-
16	22.07.09	84	nein	3	0	0	2	re	RER+
17	19.11.16	78	nein	3	2	X	2	R	RER-
18	13.03.50	44	ja	is	0	0	2	li	RER-
19	08.06.23	70	ja	2	0	0	2	R	RER-
20	01.07.37	57	nein	2	0	X	2	re	lowMin+
21	01.07.37	57	nein	3	2	0	3		RER-
22	03.06.33	60	nein	4	2	1	3	re	RER-
23	06.02.22	72	ja	is	0	0	2	re	RER-
24	30.10.35	59	nein	4	3	1	3	li	RER-
25	29.04.12	82	nein	3	3	1	2	R	RER-
26	17.07.21	73	ja	3	1	0	3	re	RER-
27	21.12.55	39	nein	3	2	1	3	R	RER-

Abb. 5